

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МЕЖВИДОВОГО ГИБРИДА ДРОЖЖЕЙ (*SACCHAROMYCES* *GLOBOSUS* × *SACCH. CEREVISIAE*)

И. А. Захаров

Роль физиологического состояния клетки в мутационном процессе в настоящее время не может вызывать сомнений. Однако совершенно недостаточно изучено с этой точки зрения значение цитотрофных факторов, влияющих на регуляторные механизмы клетки и ее адаптационные возможности. Одним из путей экспериментального решения этого вопроса может явиться выделение влияния гибридизации на мутационный процесс, так как гибридизация, если она приводит к объединению в зиготе чужеродных компонентов, должна нарушать нормальные регуляторные системы в клетке. Значение гибридизации в мутационном процессе, однако, обследовано мало, по-видимому в связи с тем, что для такого исследования трудно найти подходящий объект. Удобным материалом для изучения этого вопроса являются дрожжи, так как среди них есть немало легко скрещивающихся видов (Winge и Laustsen, 1939), а мутации могут регистрироваться в ходе вегетативного размножения, что позволяет отделить их от эффектов комбинативной изменчивости.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве исходного материала были взяты систематически наиболее удаленные виды сахаромыцетов — *Sacch. cerevisiae* — пивные дрожжи и *Sacch. globosus* — дикие дрожжи (Кудрявцев, 1951).

В качестве питательной среды употреблялась среда следующего состава:

Дрожжевой экстракт	1 л
Сахароза или глюкоза	20 г
K ₂ HPO ₄	2 г
MgSO ₄	1 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 г

В необходимых случаях к среде добавлялось 2% агара. Для массовых посевов на чашки Петри дрожжевой экстракт заменялся 1% раствором дрожжевого автолизата.

Для идентификации дыхательных мутантов использовалась среда, сахар в которой был заменен лактатом кальция в количестве 1%. Копуляция клеток и спор дрожжей наблюдались в жидкой среде обычного состава, разлитой в пробирки по 1 мл. Спорообразование

индуцировалось переносом культуры, выросшей на обычной агаризованной среде, на среду следующего состава:

Дистиллированная вода	1 л
Ацетат натрия	10 г
KCl	5 г
Агар	20 г

Определение способности к сбраживанию сахаров проводилось на обычной среде с испытуемым сахаром в пробирках с поплавками. Выращивание культур производилось в термостате при температуре $30 \pm 0,5^\circ$. Остальные методы описываются ниже, по ходу изложения опытов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РОЗОВОГО МУТАНТА ДЛЯ КОНТРОЛИРОВАННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ЗИГСТ

В нашем распоряжении имелись следующие культуры изучаемых видов: *Sacch. globosus* 349 — гомоталличный диплоид с обильным спороношением, имеющий овальные клетки; *Sacch. cerevisiae* XII (линия раса) — гетероталличный диплоид, хорошо спорулирующий, клетки овальной формы; *Sacch. cerevisiae* XII-63 — гаплоид, выделенный в лаборатории проф. К. В. Косикова из одной споры предыдущей культуры, имеет круглые клетки, не спорулирует.¹

Неподлежащие в работе виды отличались по способности сбраживать дисахариды; *Sacch. cerevisiae* сбраживает мальтозу и сахарозу, а *Sacch. globosus* не сбраживает. Тип спаривания гаплоидной культуры α был неизвестен; для его определения были использованы гаплоидные линии проф. Б. Эфрусен. Производя совместные посевы клеток линии 63 с разными стандартными линиями, мы наблюдали обильную конуляцию в комбинациях $63 \times 1274-2c$ и $63 \times 1274-3d$. Линии 1274-2c и 1274-3d принадлежат к типу спаривания α , таким образом, тип спаривания культуры 63 был определен как α .

Виды *Sacch. globosus* и *Sacch. cerevisiae* отличаются некоторыми особенностями жизненного цикла. *Sacch. cerevisiae* является гетероталличным организмом. Его изолированные аскоспоры дают устойчивые гаплоидные линии, принадлежащие к одному из двух типов спаривания (α или α'); клетки таких линий не подвергаются диплоидизации, а конуляция происходит лишь между клетками из линий противоположного полового типа (Lindegren, 1949). В отличие от *Sacch. cerevisiae* *Sacch. globosus* — гомоталличный вид. В потомстве одной споры происходит самодиплоидизация и гаплоидные клоны у этого вида таким образом не существуют (Косиков, 1954).

Линдегрэн (Lindegren, 1949) для получения гибридов у гетероталличных дрожжей предложил метод массового спаривания, основанный на выделении зигот, образующихся при смешении клеток противоположного типа спаривания. Очевидно, что для гибридизации гомоталличных дрожжей или для получения гибридов между гомо- и гетероталличными формами метод массового спаривания не применим.

Интересующие нас гибриды между *Sacch. globosus* и *Sacch. cerevisiae* могли бы быть получены по методу Винге и Лаустзена (Winge a.

¹ Культуры были нам предоставлены проф. Косиковым К. В., за что приносим ему благодарность.

Laustsen, 1938) попарным соединением аскоспор. Из-за большой трудоемкости этого метода, основанного на микроманипуляции, мы от него отказались, решив применить методику селекции гибридных зигот. На этом принципе основывается сейчас большинство работ по гибридизации микроорганизмов; в частности, он оправдал себя и при получении гибридов у гомоталличных грибов. Так, при работе с гомоталличной плесенью *Aspergillus nidulans* используются различные приемы селекции: по биохимическим мутациям, по мутациям, изменяющим окраску, а также комбинированная селекция, при которой учитываются и биохимические и морфологические признаки (Pontecorvo, 1953). Этот прием комбинированной селекции был применен в данной работе. Известно,

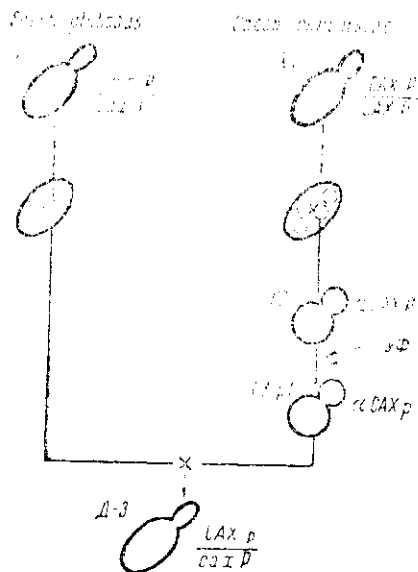


Рис. 1. Схема происхождения изученных в работе культур.

САХ — способность сбраживать сахарозу; сах — неспособность сбраживать сахарозу; Р — белая окраска колонии; р — розовая окраска колонии; — тип спаривания; УФ — облучение ультрафиолетовым светом.

рецессивный маркер для второй родительской культуры и позволило перейти к получению межвидовых гибридов. Для этого в пробирки со средой для копуляции производился обильный посев клеток линии 63-р1, спорулирующих клеток *Sacch. globosus* или совместный посев и тех и других. Через двадцать четыре часа в пробирках с посевом линии 63-р1 наблюдались лишь округлые клетки гаплоида; в посеве *Sacch. globosus* — вегетативные овальные клетки, а также прорастающие и копулирующие аскоспоры. В совместном посеве наряду с перечисленными формами клеток встречались типичные для гетероталличных сахаромисетов зиготы — крупные, неправильной формы, часто с выростами и перетяжками, отличные от копулирующих спор *Sacch. globosus*.

Было предположено, что эти зиготы возникают при слиянии гаплоидных клеток *Sacch. cerevisiae* 63-р1 с гаплоидными же прорастающими аскоспорами *Sacch. globosus* 349. Из перечисленных культур были сделаны рассевы на селективную среду с сахарозой. 63-р1 дал розовые

что *Sacch. globosus* обладает рецессивными признаками неспособности сбраживать сахарозу и меляноту (Косилов, 1954). Для того, чтобы генетически маркировать рецессивным признаком и вторую родительскую культуру, *Sacch. cerevisiae* было проведено облучение ультрафиолетовыми лучами клеток культуры 63. Среди полученных тысяч колоний, выросших из облученных клеток, было обнаружено несколько розовых, из которых выделены розовые линии, в частности 63-р1. Эти мутанты, уже давно известные в генетике дрожжей, образуют на твердых средах розовые колонии, с возрастом становящиеся красно-коричневыми. Образование красного пигмента связано с генетическим блоком в синтезе аденина; наследуется этот признак как простой рецессив (Lindgren, 1949). Выделенные формы были стабильными и сохраняли половую тенденцию исходной культуры.

Получение розового мутанта *Sacch. cerevisiae* дало недостающий

мелкие колонии. Клетки *Sacch. globosus* 349 на среде с сахарозой (которую они не сбраживают) образовывали медленно растущие, сероватой окраски, плоские колонии. Наконец, в рассеве смешанной культуры, наряду с колониями исходных типов, были обнаружены крупные белые, выпуклые сахарозаположительные колонии. Было предположено, что они имеют гибридную природу и происходят от зигот, образовавшихся при слиянии клеток 63-р1 и спор 349. От одной родительской линии гибрид унаследовал способность к сбраживанию сахарозы, а от другой — белую окраску колоний.

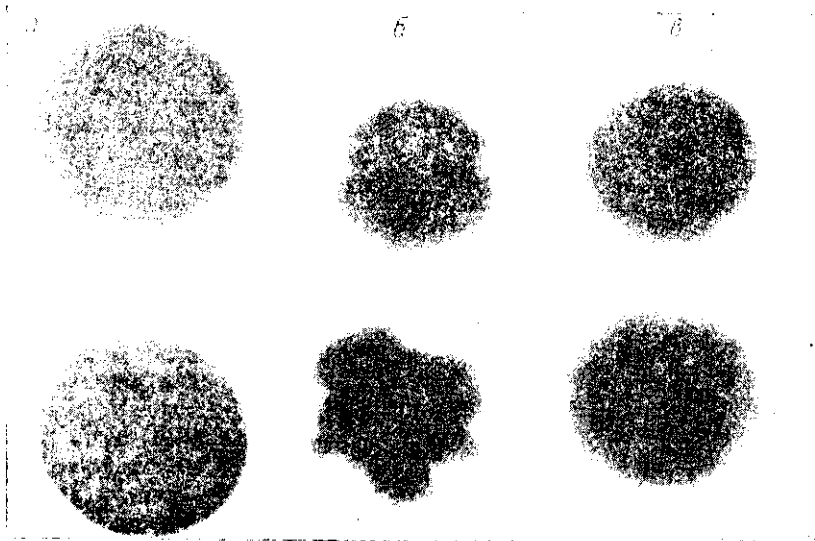


Рис. 2. Колонии на твердой среде.

а — *Sacch. globosus* 349; б — гибрида Д-3; в — *Sacch. cerevisiae* XII.

Из одной такой гибридной колонии после повторного посева выделена культура Д-3. Она обладала способностью сбраживать сахарозу и мальтозу и в соответствующих условиях обильно спорулировала. Гибридное происхождение культуры Д-3 было доказано при изучении полученного от нее второго поколения. При вегетативном размножении эта культура по признаку белой окраски колоний оказалась стабильной — так, из просмотренных примерно 50 000 колоний лишь 5 колонии имели красные сектора. Однако достаточно было клетки Д-3 перенести на среду для споруляции, а образовавшиеся затем споры (клетки второго полового поколения) посеять, как закономерно в значительном количестве появлялись красные колонии, что и ожидалось при расщеплении во втором половом поколении.

Вся родословная исследованных в работе культур изображена на рис. 1. Гибрид Д-3 по морфологии клеток и асков не отличался от родительских форм, но превосходил их по размеру клеток. Колонии гибрида на твердой среде отличались от колоний исходных видов (рис. 2). Начиная с 3—4-го дня роста, их края становятся неровными, как бы изъеденными, что резко отличает их от круглых, правильной формы колоний обоих родительских видов. Выяснение причин такой своеобразной морфологии колоний гибрида Д-3 привело к установлению его высокой мутабельности.

МУТАБИЛЬНОСТЬ ГИБРИДА

При внимательном рассмотрении колоний гибрида Д-3, выросших на твердой среде, было замечено, что в колониях, начиная с третьего-четвертого дня, обычно можно различить две зоны — основу колонии с ровным краем и участки вторичного роста. Эти участки начинаются в центре колонии и образуют как бы языки, спускающиеся от центра к краям, а затем обрастающие край колонии (рис. 3). Для проверки предположения о том, что эти части колонии состоят из наследственно неодинаковых клеток, были сделаны рассевы из основы колонии (материал брался с края) и из языка. Результаты этих рассевов полностью подтвердили химерность колоний гибрида (рис. 3). При посеве на

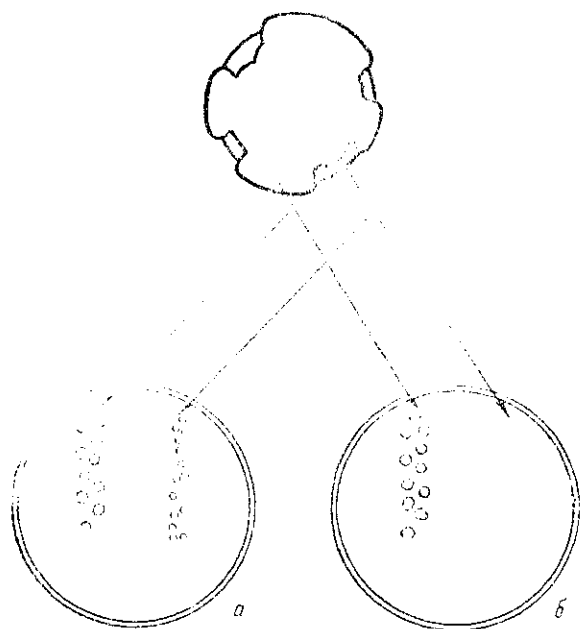


Рис. 3. Химерность колоний гибрида Д-3.

а — посев на среду с сахаром; б — посев на среду с лактатом.

следственным повреждением способности к дыханию, так называемых аэр-мутантов.

Для определения концентрации мутантных клеток в отдельных колониях на чашки Петри высевалось примерно по 200 клеток; через 4 суток изолированные колонии в стерильных условиях вырезались с кусочком агара и переносились в пробирку со стерильной водой, где клетки колонии тщательно суспензировались. Соответствующее разведение суспензии высевалось на чашки Петри. Просчет общего числа колоний и содержания среди них аэр-мутантов производился на третий день. К этому времени аэр-мутанты легко отличались от нормы; образованные ими колонии были снежно-белыми, мелкого размера, в отличие от крупных кремовых немутантных колоний. Ряд мутантных колоний для контрольной проверки был посеян на лактат.

Содержание аэр-мутантных клеток в отдельных колониях гибрида Д-3 указано в табл. 1. Во всех колониях обнаруживается высокий, хотя и сильно варьирующий процент аэр-мутантов.

Таблица 1

Содержание аэр-мутантов в отдельных колониях гибрида Д-3

№ рассеянной колонии	Учтено колоний в рассеве	Из них аэр-мутантов	
		число	%
1	1021	175	$17,1 \pm 1,17$
2	1111	115	$10,3 \pm 0,91$
3	852	133	$15,4 \pm 1,23$
4	724	85	$11,8 \pm 1,20$
5	1418	21	$1,4 \pm 0,31$
6	714	444	$62,1 \pm 1,82$
7	1354	41	$3,0 \pm 0,46$
8	976	344	$35,2 \pm 1,53$
9	528	218	$41,2 \pm 2,14$
10	1811	258	$14,2 \pm 0,82$

Накопление в популяции клеток аэр-мутантов могло бы вызывать-ся двумя причинами: во-первых, селективным преимуществом мутант-ных клеток перед нормальными и, во-вторых, очень высокой частотой спонтанного мутирования к состоянию дыхательной недостаточности клеток гибрида Д-3.

Для выбора между этими двумя возможностями был определен темп размножения мутантных и нормальных клеток на твердой среде с сахарозой. Определение производилось путем прямого микроскопиче-ского подсчета числа клеток через последовательные про-межутки времени в выборке из ста микроколоний. Кри-вые размножения, приве-денные на рис. 4, показыва-ют значительно более мед-ленной темп размножения аэр-мутантов по сравнению с нормой. Это обстоятель-ство исключает возможность накопления аэр-мутантов за счет селективного ме-ханизма. Об этом говорит и появление зон вторичного роста, образуемых нормаль-ными клетками, что связано с преимуществом нормаль-ных клеток перед мутанта-ми.

Таким образом, высокий процент аэр-мутантов в по-пуляции гибридных клеток должен быть приписан высокой частоте мутирования нормальных кле-ток при их размножении на твердой среде.

В качестве посевного материала в описанных опытах использова-лись клетки Д-3, выросшие на твердой среде; соответствующая про-верка на среде с лактатом показала, что они являются нормальными по дыханию. При формировании и росте колонии на твердой среде происходит накопление аэр-мутантов, которые начинают преобладать

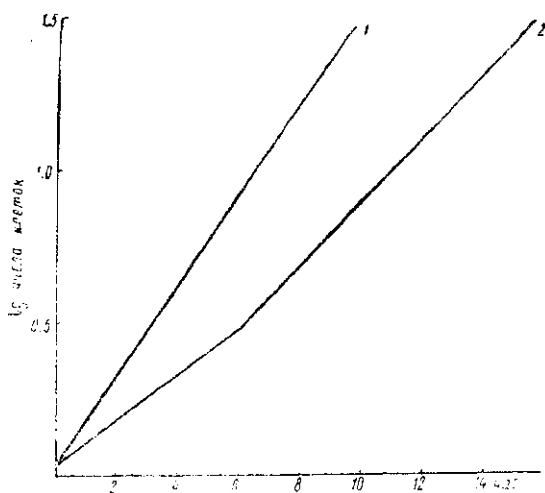


Рис. 4. Размножение клеток гибрида Д-3 на твердой среде.

1 — Д-3, нормальная культура; 2 — Д-3, аэр-мутант.

в популяции клеток колонии. В этих условиях нормальные клетки — первое потомство исходной клетки, концентрирующиеся в центре колонии и обладающие селективным преимуществом перед мутантами, — дают зоны вторичного роста, в которых, по-видимому, вновь накапливаются аэр-мутанты. Каждая колония, образованная клеткой гибрида, оказывается, таким образом, ареной действия сил микроэволюции — мутационного процесса и естественного отбора.

Является ли высокая мутабельность особенностью нашего гибрида или накопление аэр-мутантов в колониях на твердой среде обычное для дрожжей явление? Чтобы выяснить это, мы сравнили гибрид с обоими родительскими видами. Определение процента аэр-мутантов проводилось в смывах четырехдневных колоний, образовавшихся при посеве на чашку примерно по 200 клеток. Результаты табл. 2 показывают, что высокая мутабельность является специфической особенностью гибрида и не свойственна исходным видам.

Таблица 2

Содержание аэр-мутантов в культурах исходных видов и гибрида Д-3 на твердой среде

Вид культуры	Учтено колоний	Из них аэр-мутантов	
		число	%
<i>Sacch. globosus</i> aB	3889	19	0,5 ± 0,11
Гибрид Д-3	2960	318	10,7 ± 0,57
<i>Sacch. cerevisiae</i> XII	4328	14	0,3 ± 0,08

В этих опытах колонии гибрида Д-3 развивались на среде с сахарозой (родительские формы *Sacch. cerevisiae* — на сахарозе, *Sacch. globosus* на глюкозе). Мы предположили, что высокая частота мутирования гибрида на среде с сахарозой обусловлена гетерозиготностью гибрида по способности сбраживать этот сахар. Для выяснения этого было проведено сравнение содержания аэр-мутантов в колониях, выросших на среде с сахарозой и на среде с глюкозой (сахар, сбраживаемый обоими родительскими видами). Результаты, приведенные в табл. 3,

Таблица 3

Влияние сахаров на содержание аэр-мутантов в культурах гибрида Д-3 на твердой среде

Используемый сахар	Учтено колоний	Из них аэр-мутантов	
		число	%
Сахароза	2960	318	10,7 ± 0,57
Глюкоза	2591	189	7,3 ± 0,51

показывают, что высокая мутабельность гибрида не зависит от его гетерозиготности по способности сбраживать сахарозу, так как она выявляется и при росте на глюкозе. Однако, колонии гибрида, развившиеся на глюкозе, обнаруживают все же меньшее содержание аэр-мутантных клеток, чем при росте на сахарозе. Это может быть

связано как с изменением частоты мутирования, так и с изменением давления отбора.

В других условиях культивирования частота появления аэр-мутантов у гибрида Д-3 может резко снижаться. Так, при росте гибрида на

Таблица 4

Содержание аэр-мутантов в культурах на жидкой среде

Вид, культура	Учено колоний	Из них аэр-мутантов	
		число	%
<i>Sacch. globosus</i> 349	6492	26	$0,4 \pm 0,08$
Гибрид Д-3	4098	7	$0,2 \pm 0,07$
<i>Sacch. cerevisiae</i> XII	5778	58	$1,0 \pm 0,13$

жидкой среде его высокая мутабельность полностью не проявляется, что видно из результатов табл. 4; в этих условиях культура как бы «стабилизируется».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выделение пигментной мутации у гаплоида *Sacch. cerevisiae* позволило разработать простой метод контролируемого получения внутри- и межвидовых гибридов дрожжей. Этот метод был применен для получения отдаленного межвидового гибрида *Sacch. globosus* × *Sacch. cerevisiae*. При изучении гибридной культуры обнаружилось высокое содержание в популяции гибридных клеток аэр-мутантов, клеток с наследственно-блокированной способностью к дыханию. Изучение темпа размножения гибридных мутантных и нормальных клеток показало значительно более низкую скорость делений мутантов в изученных условиях; их накопление в популяции в связи с этим было приписано высокой частоте спонтанного мутационного процесса.

Для понимания возможного генетического механизма описанного явления необходимо сказать о природе возникающих аэр-мутантов. В описанных опытах аэр-мутанты появлялись в диплоидной культуре. Как известно (Ephrussi a. Hottinguer, 1951), аэр-мутантные диплоиды дрожжей полностью стерильны из-за потери способности к спорообразованию. Это обстоятельство делает невозможным прямой генетический анализ природы выделенных нами аэр-мутантов. Ряд косвенных соображений дает основание утверждать, что они являются цитоплазматическими.

1. Наблюдающаяся высокая частота мутирования не свойственна ядерным факторам, но неоднократно описывалась для цитоплазматических факторов (James a. Spencer, 1958).

2. Хотя фенотип аэр-мутантов может появляться в результате как ядерной, так и цитоплазматической мутации, но ядерная мутация является рецессивной и поэтому не могла бы проявляться у диплоидов (Ephrussi a. Hottinguer, 1951).

3. Возникающие мутации не могут быть связаны с хромосомными нарушениями. Изученная культура при вегетативном размножении оказывалась высоко стабильной по хромосомному маркеру — фактору розовой окраски; это свидетельствует об отсутствии заметных хромо-

мутабельности межвидового гибрида дрожжей. Предположение о сниженных адаптационных возможностях гибридных клеток и об их большей чувствительности к изменению внешних условий оказывается доступным экспериментальной проверке.

ВЫВОДЫ

1. Предложен метод получения межвидовых гибридов дрожжей с использованием гаплоидных линий, генетически маркированных мутацией, вызывающей накопление розового пигмента.

2. С помощью описанного метода получен межвидовой гибрид *Sacch. globosus* × *Sacch. cerevisiae*. Гибридная культура обнаружила высокую цитоплазматическую нестабильность, выщепляя в ходе вегетативного размножения цитоплазматические аэр-мутанты — клетки с наследственной дыхательной недостаточностью.

3. Высокая мутабельность гибрида проявляется лишь при росте на твердых средах. На жидкой среде культура оказывается стабильной.

CYTOPLASMIC INSTABILITY OF THE INTERSPECIFIC YEAST HYBRID (*SACCHAROMYCES GLOBOSUS* × *SACCH. CEREVISIAE*)

I. A. Zakharov

The interspecific hybrid *Sacch. globosus* × *Sacch. cerevisiae* has been produced by mating the cells of the haploid strain of *Sacch. cerevisiae* (the α mating type) genetically marked with a mutation causing the pink colour of the colony to the spores of *Sacch. globosus*. The white colour of the colony and the capability of sucrose fermentation were the criteria for the selection of hybrid zygotes. The isolated hybrid exhibits a considerable cytoplasmic instability, the respiration-deficient cells (cytoplasmic aer-mutants) frequently appearing in the course of the vegetative reproduction. The high mutability of the hybrid is manifested only on a solid medium; cultures grown on a liquid medium proved to be stable. The phenomenon described is considered to be an instance of mutability being increased by hybridization.

ЛИТЕРАТУРА

- Бельговский М. Л. 1934. Докл. АН СССР, 4, 1—2: 108—112.
Косиков К. В. 1954. Гибридизация дрожжей и методы селекции дрожжевых культур. Изд. АН СССР.
Кудрявцев В. И. 1954. Систематика дрожжей. Изд. АН СССР.
Лобашев М. Е. 1947. Вестник ЛГУ, 8: 10—29.
Соколов Н. Н. 1959. Взаимодействие ядра и цитоплазмы при отдаленной гибридизации животных. Изд. АН СССР.
Caspari E. 1948. Adv. genetics, 2: 2—66.
Ephrussi B. and E. Hottinguer, 1951. Cold Spring Harbor symposia, 16: 75—85.
James A. P. and P. E. Spencer, 1958. Genetics, 43, 3: 315—331.
Lederberg J. and E. M. Lederberg 1952. J. bacter., 63, 3: 399.
Lindegren C. C. 1949. The yeast cell. Its genetics and cytology. Saint Louis.
Mangelsdorf P. C. 1958. Cold Spring Harbor symposia, 23: 403—421.
Ogur M. and R. St-John. 1956. J. bacter., 72, 4: 500—504.
Pontecorvo G. 1953. Adv. genetics, 5: 141—238.
Sonneborn T. M. 1959. Adv. virus research, 6: 229—356.
Winge O. and O. Laustsen. 1938. C. r. Lab. Carlsberg. Sér. physiol., 22, 6: 99—119.
Winge O. and O. Laustsen. 1939. C. r. Lab. Carlsberg. Sér. physiol., 22, 21: 337—355.